

制备色谱法在纯化甜茶苷工艺中的应用

吕鑫华 况鹏群 袁其朋* 郑桂清

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 研究了从甜茶叶中纯化甜茶苷的制备工艺。首先用沸水从甜茶叶中提取甜茶苷, 提取 3 次, 每次 1 h。再利用 HP-20 大孔吸附树脂对甜茶苷粗提物进行预纯化, 以 90% 乙醇为洗脱液, 洗脱 6 倍柱体积; 浓缩去除乙醇后, 用 D-941 阴离子交换树脂脱色, 水洗并干燥得到甜茶苷粗产品, 纯度为 68.6%。最后甜茶苷粗产品经制备色谱纯化后, 得到纯度为 97.9% 的甜茶苷, 色谱条件为流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=70:30$, 流速 10 mL/min, 上样量 200 mg。

关键词: 制备色谱; HP-20 大孔吸附树脂; D-941 阴离子交换树脂; 甜茶叶; 甜茶苷

中图分类号: R284.2

引 言

甜茶叶 (*Rubus suavissimus* S. Lee), 是蔷薇科悬钩子属植物, 多年生有刺灌木, 其叶可入药入茶。甜茶叶中主要化学成分为甜茶苷 (rubusoside), 其含量约为 3% ~ 7% (质量分数); 甜茶苷甜度为蔗糖的 115 倍^[1-2]。由于甜茶苷的高甜度, 低热能的特点, 可替代蔗糖, 应用于高血压、糖尿病、肥胖等患者的保健品、食品以及药品中^[3-4]。

分离纯化甜茶苷的方法有大孔吸附树脂法^[3-5]、水提醇沉法^[6]、重结晶法^[7]、硅胶柱层析法^[8]等, 而利用制备色谱法分离纯化得到甜茶苷单体尚未有相关文献报道。制备色谱法与上述方法相比, 分离效果好, 得到的产品纯度高, 上样量大, 是一种操作简便、快速而且高效的分离纯化方法, 已被广泛应用于安石榴甙^[9]、四种环烯醚萜苷类^[10]、龙胆苦苷^[11]、积雪草甙^[12]等天然产物的分离纯化。随着合成、植化、生化和制药等领域对高纯度组份需求的不断增加, 制备色谱应用的领域也在迅速的扩大。

本文尝试利用制备色谱法深度纯化甜茶叶中的甜茶苷。希望通过大孔吸附树脂、离子交换树脂的预纯化和高效液相制备色谱的深度纯化, 获得一种制备高纯度甜茶苷的工艺, 从而为甜茶苷的生产提

供依据。

1 实验部分

1.1 实验原料

甜茶叶原料, 广西来宾; 甜茶苷标准品, 纯度 98%, 四川维克奇生物科技有限公司; 乙醇, 分析纯, 北京化工厂; 甲醇, 色谱纯, 赛默飞世尔科技有限公司; HP-20 大孔吸附树脂, 日本三菱集团公司; D-941 阴离子交换树脂, 山东鲁抗立科药物化学有限公司; AB-8、ADS-72、H-103、NKA、HP-2MG、NKA-9、HZ-816 和 HPD-100 等大孔吸附树脂, 北京绿百草科技发展有限公司。

1.2 实验仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; Waters model Pre-LC 泵系统, Waters 2487 紫外双波长检测器, 美国 Waters 公司; 分析色谱柱 (C_{18} , 4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 北京迪马科技有限公司; 制备型色谱柱 (C_{18} , 19 mm × 300 mm, 7 μm), 美国 Waters 公司; Milli-Q Academic 超纯水器, 默克密理博公司; 旋转蒸发器 RE-52A, 上海亚荣生化仪器厂; BP-211D 电子天平, 德国赛多利斯; Micromass Quattro Premier 三重四极杆质谱仪, 美国 Waters 公司; 核磁共振波谱仪 AV400, 布鲁克公司; 玻璃层析柱 (26 mm × 500 mm), 上海锦华层析设备厂。

1.3 甜茶苷的制备工艺

1.3.1 沸水提取

将 100 g 甜茶叶粉末中加入 1 L 去离子水, 沸水回流提取 1 h。过滤, 滤渣用同样的方法, 重复提取 4 次, 每次对得到的滤液进行取样, 利用分析型液相色

收稿日期: 2012-04-16

基金项目: 国家自然科学基金 (21176018)

第一作者: 女, 1988 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

谱(HPLC)检测分析,计算得到每次提取得到的甜茶苷质量(g),从而确定提取次数。

1.3.2 大孔吸附树脂纯化实验

(1) 静态实验

根据大孔吸附树脂的极性、孔径、比表面积等物性参数,选取9种有代表性的大孔吸附树脂(HP-20、AB-8、ADS-72、H-103、NKA、HP-2MG、NKA-9、HZ-816、HPD-100)进行筛选实验。1 mL树脂中加入100 mL甜茶叶提取液,置于100 r/min的摇床中过夜,取样测定吸附前提取液和吸附后残液中的甜茶苷质量浓度。用去离子水充分洗去树脂表面的甜茶苷,用100 mL 95%乙醇解析过夜,取样测定洗脱液中甜茶苷质量浓度。根据式(1)~(3),计算树脂的吸附率 q (%)、吸附量 Q (mg/mL)和解析率 E (%)。

$$q = \frac{(\rho_0 - \rho_e)}{\rho_0} \quad (1)$$

$$Q = \frac{(\rho_0 - \rho_e)V}{V_r} \quad (2)$$

$$E = \frac{\rho'V'}{QV_r} \quad (3)$$

其中 ρ_0 、 ρ_e 和 ρ' 分别为吸附前、吸附后的提取液及洗脱液中甜茶苷的质量浓度,mg/mL; V 、 V_r 和 V' 分别为甜茶苷提取液体积,树脂体积和洗脱液体积,mL。

(2) 动态实验

将预处理好的HP-20树脂装填于26 mm × 500 mm的玻璃层析柱中,用无水乙醇洗脱除杂,再用去离子水洗至无醇味。将提取液以3 BV/h(BV为树脂柱柱体积)的流速上样,利用高效液相色谱(HPLC)检测吸附后提取液中甜茶苷的质量浓度,绘制甜茶苷的吸附穿透曲线;同样,用4 BV/h和5 BV/h的流速上样吸附并绘制相应穿透曲线。

将提取液以3 BV/h的流速上样吸附14 BV,先用去离子水洗3 BV后,用3 BV 10%乙醇洗杂质;同样,用20%乙醇和30%乙醇溶液洗杂质;利用HPLC检测,选择适当体积分数的乙醇洗脱杂质。

将提取液以3 BV/h的速度上样吸附14 BV,分别用去离子水和30%乙醇洗脱3 BV除杂,再用70%乙醇洗脱甜茶苷产品,利用HPLC检测洗脱液中甜茶苷的质量浓度,绘制甜茶苷洗脱曲线。同样,分别用80%乙醇、90%的乙醇为洗脱剂替代70%乙醇做平行实验,从而选择适当的洗脱剂。

1.3.3 D-941 阴离子交换树脂脱色

大孔吸附树脂预纯化后的粗品,加两倍体积的去离子水溶解,利用预处理好的D-941阴离子交换树脂层析柱脱色,去离子水洗脱,减压旋蒸得到甜茶苷粗产品。

1.3.4 制备色谱

利用分析型HPLC确定制备色谱的流动相。根据式(4)~(6)测定不同流动相条件下,甜茶苷的色谱参数——出峰时间 t ,保留因子 k' ,选择因子 α 和分离度 R_s ,从而确定合适的流动相。

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (4)$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (5)$$

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(W_2 + W_1)} \quad (6)$$

其中 t_R 为保留时间, t_M 为死时间; k'_1 和 k'_2 分别为色谱图上相邻峰的保留因子; t_{R1} 和 t_{R2} 为二相邻峰各自的保留时间, W_1 和 W_2 为它们基线处的峰宽, $R_s \geq 1.5$ 时,两峰可完全分离。

确定流动相后,在相同上样量条件下,测定不同流速条件下得到的产品纯度,以确定合适的流速;最后在相同流速条件下,测定不同上样量条件下得到的产品纯度,以确定上样量。

1.4 分析方法

1.4.1 甜茶苷质量浓度和纯度的测定

利用HPLC测定甜茶苷质量浓度。色谱柱为反相 C_{18} 分析柱,流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}} = 75:25$,流速1 mL/min,柱温30℃,检测波长213 nm,进样量10 μ L,采用外标法定量。

1.4.2 质谱分析

电离模式ESI(+),离子源温度100℃,质量扫描范围0~1000,毛细管电压3.0 kV,脱气温度350℃,锥孔反吹气流量45 L/h,脱溶剂气流量602 L/h。

1.4.3 核磁分析

$^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 鉴定得到的高纯品的化学结构。溶剂为氘代二甲基亚砜(DMSO-d_6),内标物四甲基硅烷(TMS),测定温度25℃,循环延迟2 s,氢谱扫描次数16次;碳谱扫描次数1024次。

2 结果与讨论

2.1 沸水提取次数的确定

通过多次沸水提取实验及HPLC测定,得到了

每次沸水提取所得的甜茶苷质量关系,见表1。

表1 每次提取得到的甜茶苷质量
Table 1 The quantity of rubusoside obtained in each extraction

提取批次	m/g	提取批次	m/g
第1次	2.466	第4次	0.070
第2次	0.916	第5次	0.033
第3次	0.515		

从表1可以看出,第4次提取得到甜茶苷质量远少于第3次提取得到的甜茶苷质量,因此在本实验中,用1:10的固液比沸水提取3次即可。

2.2 大孔吸附树脂纯化工艺的确定

2.2.1 大孔吸附树脂的选择

通过树脂静态吸附与解析实验,得到了相同外界条件下,不同类型树脂对甜茶苷的吸附与解析能力,并计算得到了相应树脂的吸附率,吸附量,解析率,如表2。

表2 各种树脂对甜茶苷的静态吸附率、吸附量和解析率
Table 2 Static adsorption and desorption capacities of rubusoside on different resins

树脂型号	树脂类型	$q/\%$	$Q/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$E/\%$
HP-20	非极性	85.94	58.19	93.56
HPD-100	非极性	35.62	21.60	90.35
H-103	非极性	72.65	44.06	89.01
NKA	非极性	55.68	33.77	95.62
HP-2MG	中等极性	31.62	19.17	86.73
AB-8	弱极性	56.71	34.39	91.05
HZ-816	弱极性	69.82	42.34	75.86
ADS-72	强极性	75.32	45.68	86.37
NKA-9	极性	32.22	19.54	68.69

从表2可以看出,HP-20大孔吸附树脂对甜茶苷的吸附量最大,为58.19 mg/mL,这是由于HP-20大孔吸附树脂有较大的比表面积,且为非极性树脂,这都有利于树脂对甜茶苷的吸附;同等甜茶苷质量浓度下,该型号树脂对甜茶苷的吸附率也最大,为85.94%;相同体积分数的乙醇洗脱,HP-20树脂对甜茶苷的解析率为93.56%,仅次于NKA大孔吸附树脂;因此,HP-20树脂比其他8种型号的树脂更适于甜茶苷的分离纯化。

2.2.2 HP-20树脂吸附条件的确定

不同上样流速条件下,甜茶苷的穿透曲线如图1。

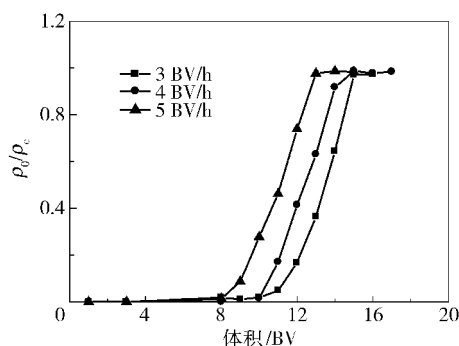


图1 不同流速条件下甜茶苷的穿透曲线

Fig. 1 Dynamic leakage curves at different flow rate

由图1可以看出,相同上样浓度,上样吸附流速为5 BV/h时,甜茶苷较流速为3 BV/h和4 BV/h的先穿透HP-20大孔吸附树脂柱;上样流速为4 BV/h时,比3 BV/h的先穿透HP-20树脂柱;为了充分回收甜茶苷产品并有效提高HP-20树脂柱的分离效率,确定甜茶苷提取液上样流速为3 BV/h,上样体积为12 BV。

将提取液以3 BV/h的流速上样12 BV后,用去离子水洗脱杂质后,再用3 BV的10%乙醇洗涤杂质,结果表明,未有甜茶苷洗脱下来。同样,20%乙醇和30%乙醇洗脱时,洗脱液中未检测到甜茶苷。因此,用3 BV的30%乙醇洗脱杂质。不同体积分数的乙醇洗脱液洗脱曲线如图2。

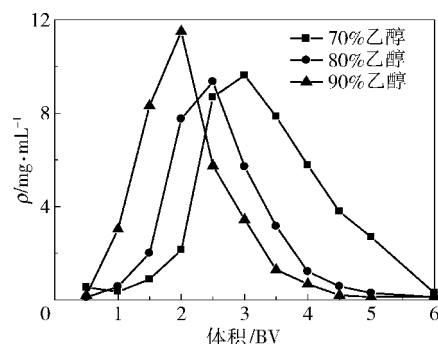


图2 不同体积分数的乙醇洗脱曲线

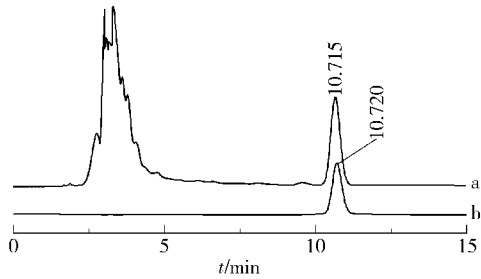
Fig. 2 Dynamic desorption curves for different ethanol concentrations

从图2可以看出,90%乙醇洗脱液洗脱效果均优于70%乙醇洗脱液和80%乙醇洗脱液。洗脱液体积确定为6 BV。因此,综上,最终确定好的HP-20树脂动态吸附与解析的条件为:上样流速3 BV/h,上样量12 BV;先用去离子水洗脱杂质,后用30%乙醇洗脱杂质,用量均为3 BV;6 BV的90%乙醇以3 BV/h的流速洗脱甜茶苷。经过上述HP-20大孔吸

附树脂分离工艺,从 1 kg 甜茶叶中分离纯化得到 32.58 g 甜茶苷粗品,纯度为 52.9%。

2.2.3 甜茶苷粗品的脱色

将 HP-20 大孔吸附树脂分离纯化得到的甜茶苷粗品溶于去离子水中,再经过预处理好的 D-941 阴离子交换树脂脱色,去离子水洗脱 6 BV 得到无色的甜茶苷洗脱液,减压旋干得到甜茶苷粗产品。经 HPLC 测定纯度为 68.6%,色谱图如图 3 所示。



a—经过脱色后的甜茶苷粗品; b—制备所得甜茶苷

图 3 甜茶苷粗品与单体高效液相色谱图

Fig.3 HPLC chromatograms of the rubusoside extract and purified rubusoside

2.3 制备色谱纯化甜茶苷条件的确定

利用分析型反相 C_{18} 色谱柱对甜茶苷分离纯化条件进行优化。测定不同甲醇体积分数下的甜茶苷的色谱参数,结果如表 3。

表 3 不同流动相对甜茶苷的色谱参数影响

Table 3 Effect of the composition of the mobile phase on the chromatographic parameters

$\varphi_{\text{甲醇}}/\%$	t_R/min	k'	α	R_s
65	34.47	16.59	8.21	16.34
70	17.75	8.15	4.33	12.20
75	11.23	4.70	2.79	4.58
80	8.05	3.12	2.23	2.41

根据制备色谱对分离条件的要求,选择 $R_s > 2$ 且 $k' < 10$ 的分离纯化条件,综合分离纯化时间与溶剂用量,最终选择 70% 甲醇溶液作为制备色谱的流动相。

70% 甲醇作为流动相,上样量固定为 40 mg,不同流速对甜茶苷产品纯度和出峰时间影响如表 4。从表 4 中数据来看,10 mL/min 的流动相流速较其他流速优异,对应的甜茶苷产品纯度大于 99%,且甜茶苷出峰时间较短,为 27.2 min。

以 70% 甲醇作为流动相,固定流速 10 mL/min,比较不同上样量对甜茶苷的出峰时间和产品纯度关

表 4 流速对甜茶苷产品纯度的影响

Table 4 Effect of the flow rate on the purity of rubusoside

流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	纯度/ $\%$	t_R/min
8	98.1	36.7
10	99.1	27.2
12	97.3	24.6
14	95.8	18.6

系如表 5。从表 5 可以看出,随着上样量的不断增加,分离纯化得到的甜茶苷产品纯度缓慢下降,同时,甜茶苷出峰时间也提前,但都能够使甜茶苷和杂质实现良好的分离。当甜茶苷粗品上样量为 200 mg 时,甜茶苷出峰时间为 19.5 min,且分离纯化得到的甜茶苷产品的纯度大于 97%,能够满足后期的结构鉴定要求。

表 5 上样量对甜茶苷产品纯度的影响

Table 5 Effect of the loading amount on the purity of rubusoside

上样量/mg	纯度/ $\%$	t_R/min
40	99.1	27.2
80	99.0	24.6
120	98.5	22.5
200	97.9	19.5

综上所述,最终确定制备色谱纯化条件为:流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}} = 70:30$,流速 10 mL/min,粗品上样量 200 mg,检测波长 213 nm。经过上述制备色谱分离纯化工艺,从 1g 甜茶苷粗品中,可以分离得到甜茶苷产品 651.7 mg,纯度 97.9%。在该条件下,甜茶苷粗提物的制备色谱图见图 4。

2.4 甜茶苷产品的鉴定

2.4.1 纯度分析

将制备得到的甜茶苷,用分析型 HPLC 测纯度,得到谱图见图 3,由此可以看出通过制备色谱纯化得到的甜茶苷产品为单峰,并且测得纯度为 97.9%。

2.4.2 分子量测定

将制备得到的单体干燥,用 ESI-MS 检测鉴定,得到的 ESI-MS 谱图见图 5。

从图 5 中可看出, m/z 660.6 为 $[M + \text{NH}_4]^+$ 的分子离子峰; m/z 665.5 为 $[M + \text{Na}]^+$ 的分子离子峰; m/z 681.5 为 $[M + \text{K}]^+$ 的分子离子峰。因此,产

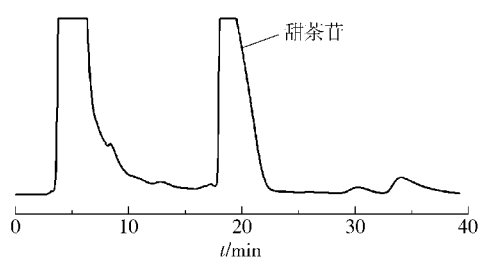


图4 甜茶苷粗提物的制备色谱图

Fig. 4 Preparative HPLC chromatogram of the rubusoside crude extract

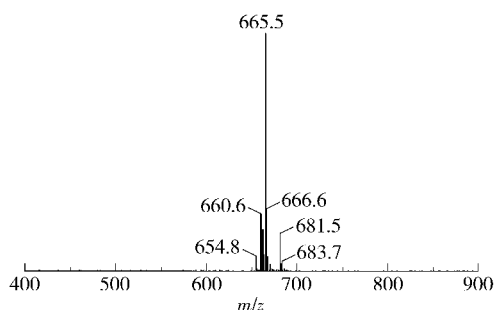


图5 甜茶苷单体质谱图

Fig. 5 ESI-MS spectra of the purified rubusoside
品分子量为 642.7, 确定得到的单体为甜茶苷。

2.4.3 结构鉴定

将制备得到并干燥好的甜茶苷单体,用 DMSO-d₆ 溶解并用 NMR 检测鉴定,得到的¹H-NMR 和¹³C-NMR 结果如下。

甜茶苷¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ: H 1.24(3H, s, H₃-18), 1.26 (3H, s, H₃-20), 5.03 (1H, br s, H₂-17), 5.56 (1H, br s, H₂-17), 19-O-Glc 6.12(1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-1), 13-O-Glc 5.12 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1)。¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: C 41.3 (C₁), 19.8 (C₂), 38.2 (C₃), 43.9 (C₄), 57.2 (C₅), 22.1 (C₆), 41.7 (C₇), 42.0 (C₈), 54.2 (C₉), 39.9 (C₁₀), 20.9 (C₁₁), 37.0 (C₁₂), 85.7 (C₁₃), 43.6 (C₁₄), 47.8 (C₁₅), 154.7 (C₁₆), 104.4 (C₁₇), 28.7 (C₁₈), 176.7 (C₁₉), 15.2 (C₂₀), 95.1 (Glc'), 100.1 (Glc'')。通过分析,确定得到的结构符合甜茶苷的结构,因此得到的产品为甜茶苷。

3 结论

(1)甜茶叶中甜茶苷的最佳提取工艺为:料液比 1:10,沸水提取 3 次,每次 1 h;使用 HP-20 树脂预纯化,得到的产品纯度为 52.9%;经 D-941 阴离子交换树脂脱色,得到甜茶苷粗品纯度 68.6%。

(2)使用制备色谱纯化甜茶苷。流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}} = 70:30$,流速 10 mL/min,甜茶苷粗品上样量 200 mg,检测波长 213 nm。利用此条件,得到纯度为 97.9% 的甜茶苷单体。

参考文献:

- [1] Chou G X, Xu S J, Liu D, et al. Quantitative and fingerprint analyses of Chinese sweet tea plant (*Rubus suavissimus* S. Lee)[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2009, 57: 1076-1083.
- [2] 马建春, 何伟, 伍振峰. 甜茶素的研究进展[J]. 食品与药品, 2008, 10(5): 73-75.
Ma J C, He W, Wu Z F. Progress on rubusoside in *Rubus suavissimus* S. Lee[J]. Food and Drug, 2008, 10(5): 73-75. (in Chinese)
- [3] 周如金, 黄敏, 张玲, 等. 大孔吸附树脂提取甜茶苷的研究[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(5): 35-39.
Zhou R J, Huang M, Zhang L, et al. Study on extraction of rubusoside from *Rubus suavissimus* S. Lee by macroporous resins adsorption[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2008, 28(5): 35-39. (in Chinese)
- [4] Koh G Y, McCutcheon K, Zhang F, et al. Improvement of obesity phenotype by Chinese sweet leaf tea (*Rubus suavissimus*) components in high-fat diet-induced obese rats[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2011, 59: 98-104.
- [5] 何伟平, 张耀奇. 甜茶素的研制[J]. 广西轻工业, 1998(1): 23-26.
He W P, Zhang Y Q. The preparation of rubusoside[J]. Guangxi Light Industry, 1998(1): 23-26. (in Chinese)
- [6] Koh G Y, Chou G X, Liu Z J. Purification of a water extract of Chinese sweet tea plant (*Rubus suavissimus* S. Lee) by alcohol precipitation[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2009, 57: 5000-5006.
- [7] 王玉娥, 龚晨睿, 田洁, 等. 湖北省通山甜茶贰提取与纯化[J]. 公共卫生与预防医学, 2008, 19(5): 23-24.
Wang Y E, Gong C R, Tian J, et al. Purification of rubusoside from Tongshan *Rubus suavissimus*[J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2008, 19(5): 23-24. (in Chinese)
- [8] 王剑霞, 吕华冲. 广西甜茶二萜类成分的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 664-665.
Wang J X, Lu H C. Studies on the diterpenoids of *Rubus suavissimus* S. Lee[J]. Lishizhen Medicine and Material Medica Research, 2008, 19(3): 664-665. (in Chinese)

- [9] Lu J J, Ding K, Yuan Q P. One-step purification of punicalagin by preparative HPLC and stability study on punicalagin[J]. Separation Science and Technology, 2011, 46: 147-154.
- [10] Yang L, Wang Y, Wang L X, et al. Rapid quantification of iridoid glycosides analogues in the formulated Chinese medicine Longdan Xiegan Decoction using high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216: 2098-2103.
- [11] 雷宇佳, 高明哲, 王莉, 等. 制备型高效液相色谱法分离纯化川西獐牙菜提取物中的龙胆苦苷[J]. 色谱, 2010, 28(9): 902-904.
- Lei Y J, Gao M Z, Wang L, et al. Preparation of gentiopicoside from the extract of *Swertia mussotii* Franch by preparative high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2010, 28(9): 902-904. (in Chinese)
- [12] 高明哲, 袁晓艳, 肖红斌. 制备型高效液相色谱法从积雪草提取物中分离纯化积雪草甙和羟基积雪草甙对照品[J]. 色谱, 2008, 26(3): 362-365.
- Gao M Z, Yuan X Y, Xiao H B. Preparation of asiaticoside and madecassoside from the extract of *Centella asiatica* (L.) Urb using preparative high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2008, 26(3): 362-365. (in Chinese)

The use of preparative HPLC in the purification of rubusoside from *Rubus suavissimus* S. Lee leaves

LU XinHua KUANG PengQun YUAN QiPeng ZHENG GuiQing

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The preparative separation of rubusoside from the leaves of *Rubus suavissimus* S. Lee has been investigated. First, the leaves were extracted three times using boiling water, with an extraction time of 1 h. Second, HP-20 macroporous resins were used in the pre-purification procedure, with 6BV of 90% ethanol in water used as the eluent. Third, the solution was evaporated to remove ethanol and loaded onto pretreated D-941 anion-exchange resin for decoloration. Finally, preparative HPLC was used for further purification. Rubusoside with a purity of 97.9% was obtained from the 68.6% purity rubusoside extract after the preparative HPLC using 70% methanol in water as the mobile phase, a flow rate of 10 mL/min and a sample loading of 200 mg.

Key words: preparative HPLC; HP-20 macroporous resin; D-941 anion-exchange resin; *Rubus suavissimus* S. Lee; rubusoside